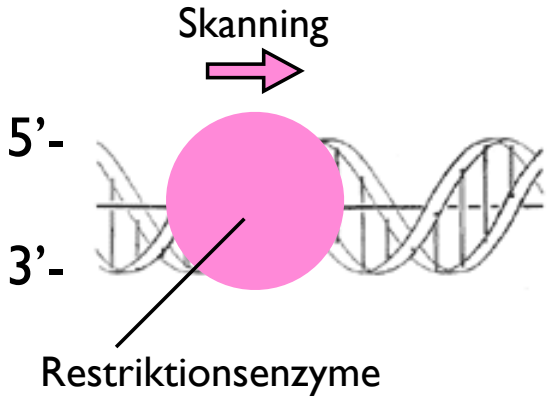
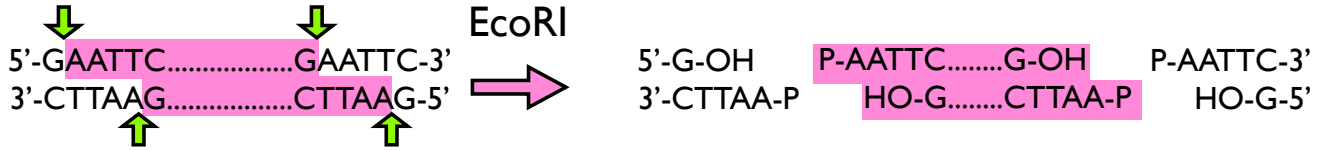
Restriktionsenzymer

Restriktionsenzymer findes
– i bakterier (forsvarsmekanisme)
– IKKE i eukaryote celler

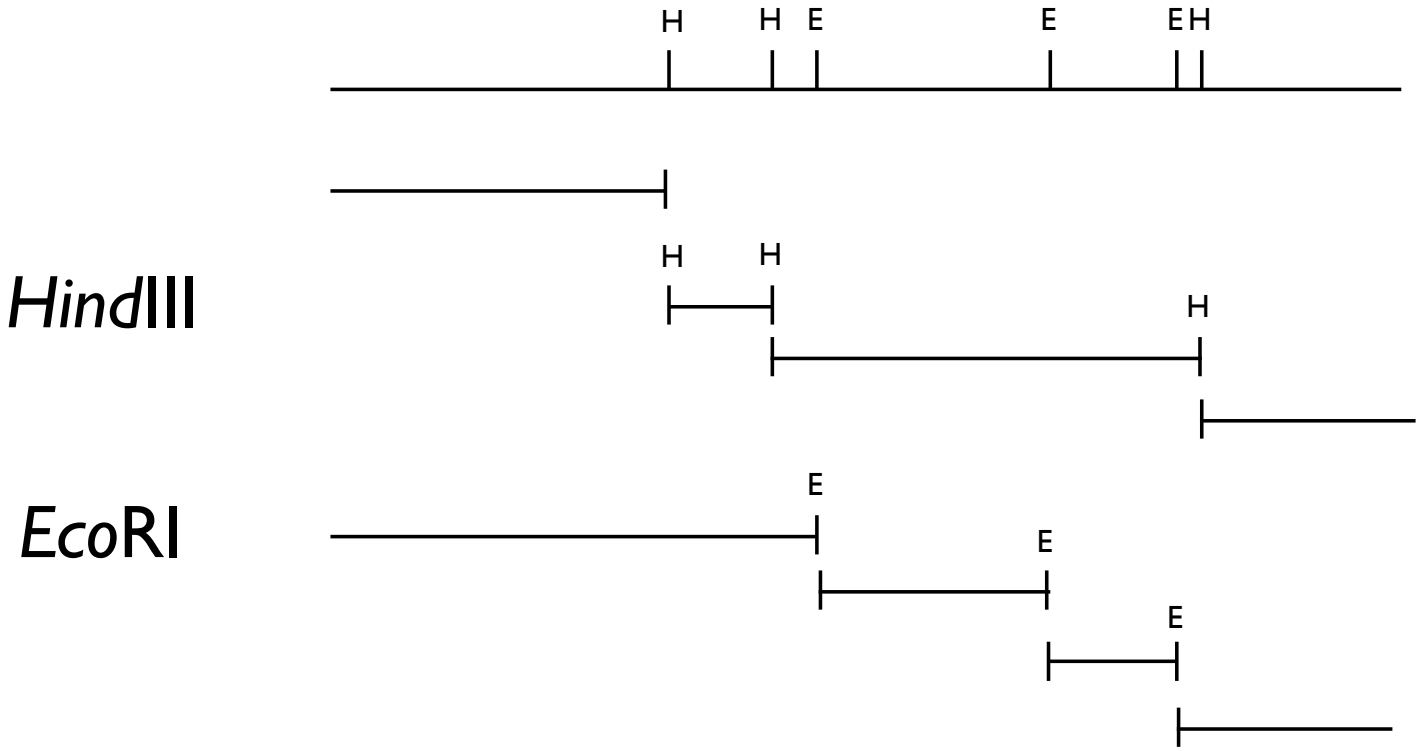


Genkendelsessekvens
– Palindromisk
– Otto, Anna, radar
– Madam I'm Adam

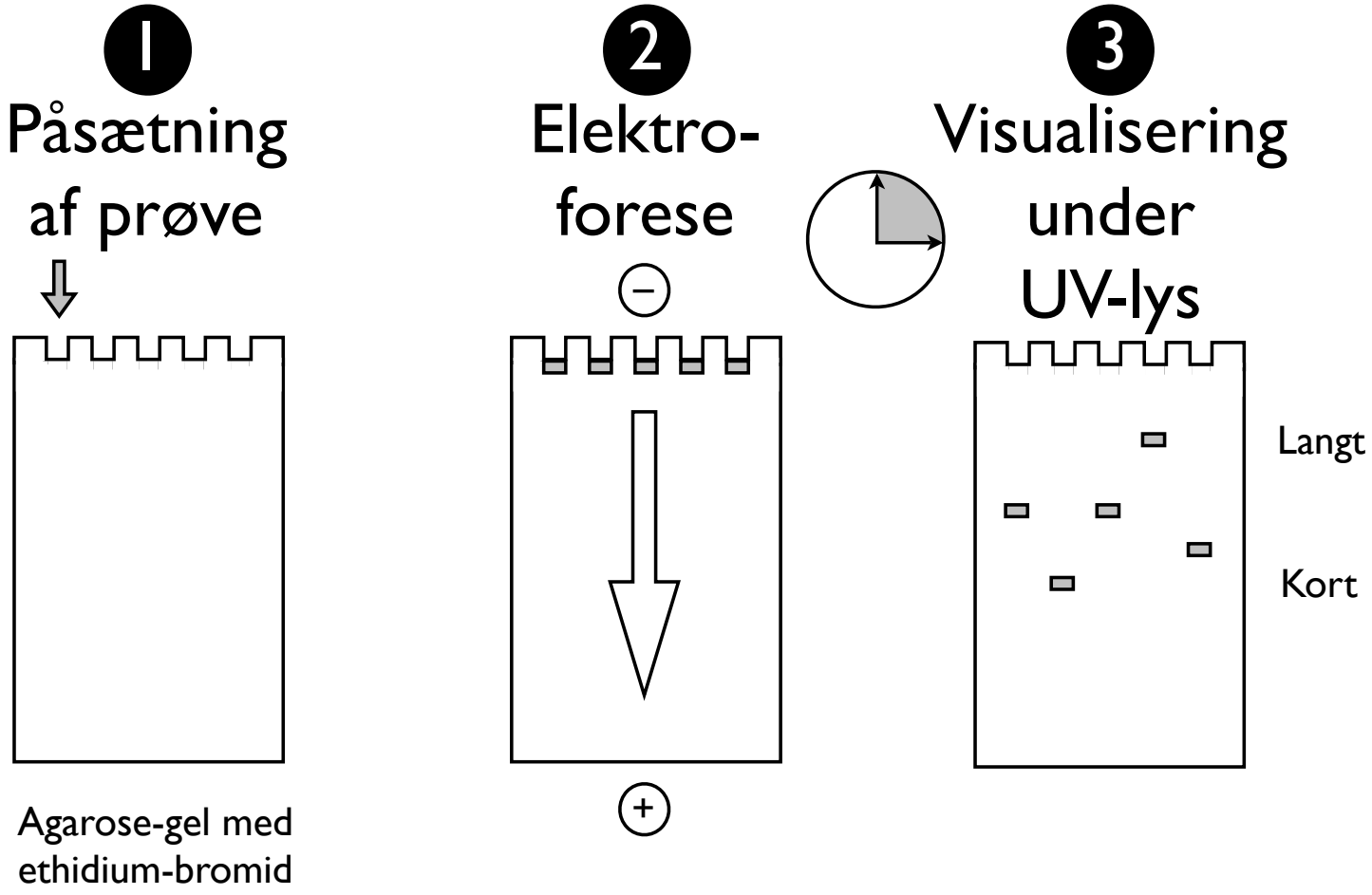
5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'



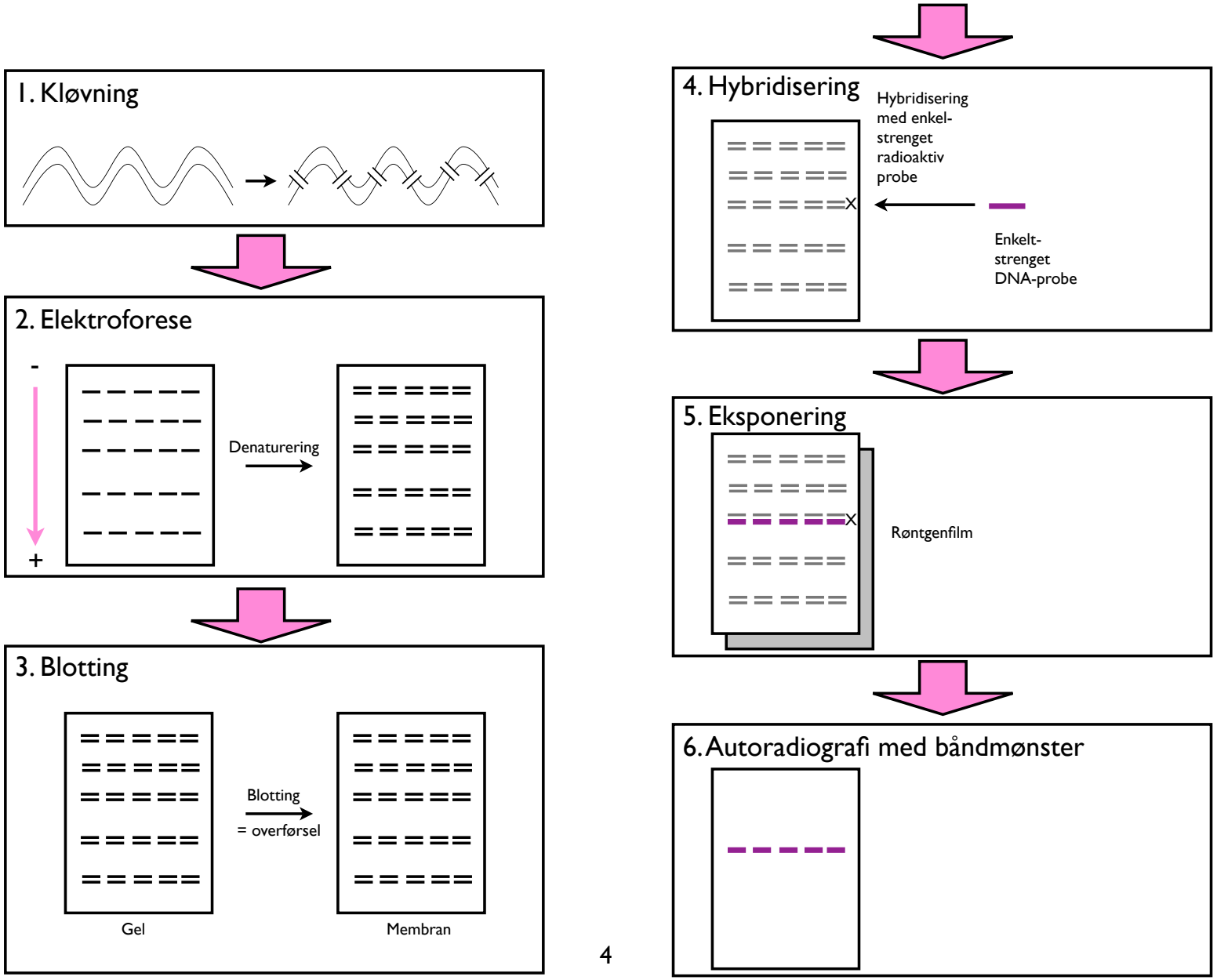
Kløvning af DNA



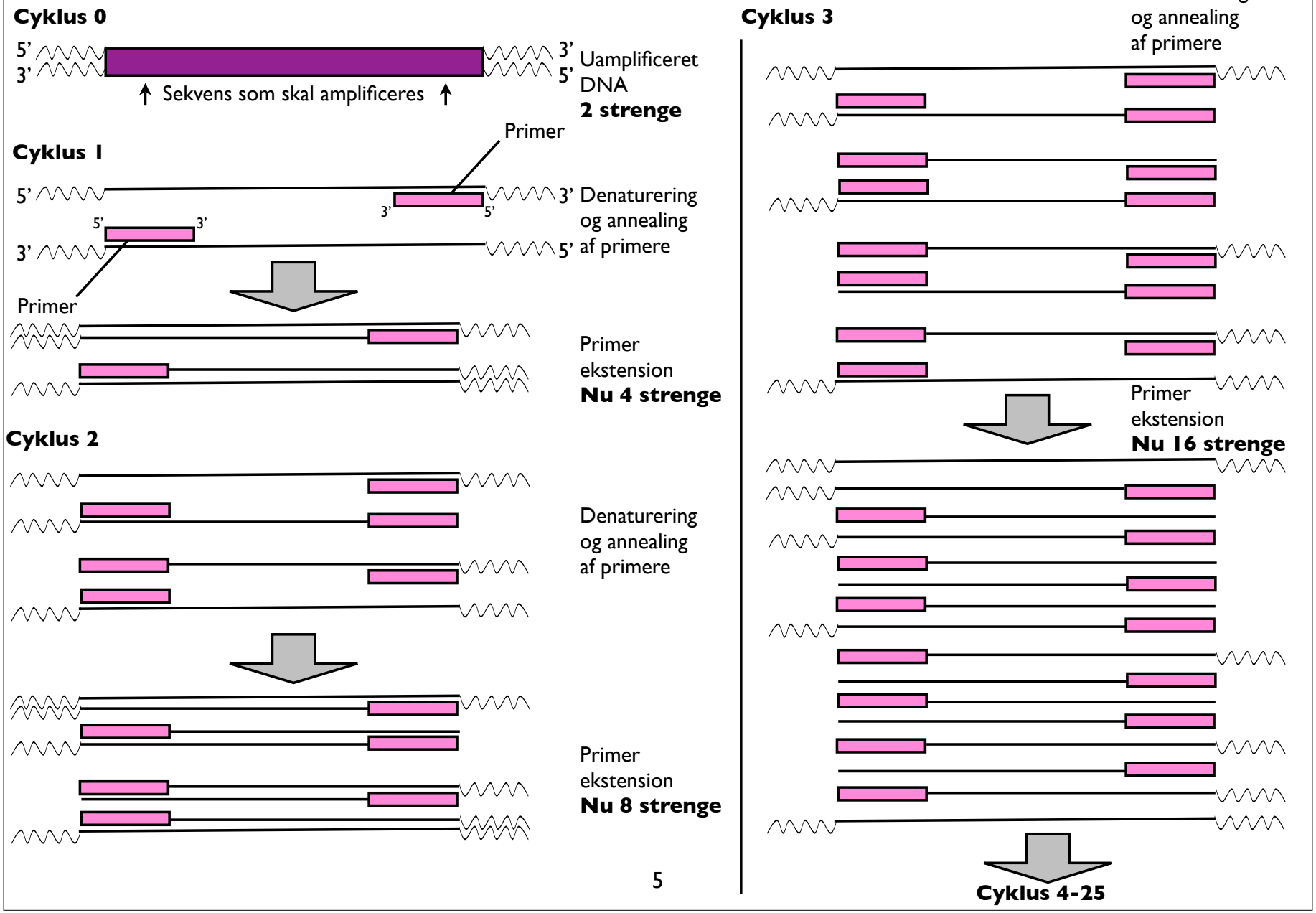
DNA gel-elektroforese



Southern blot



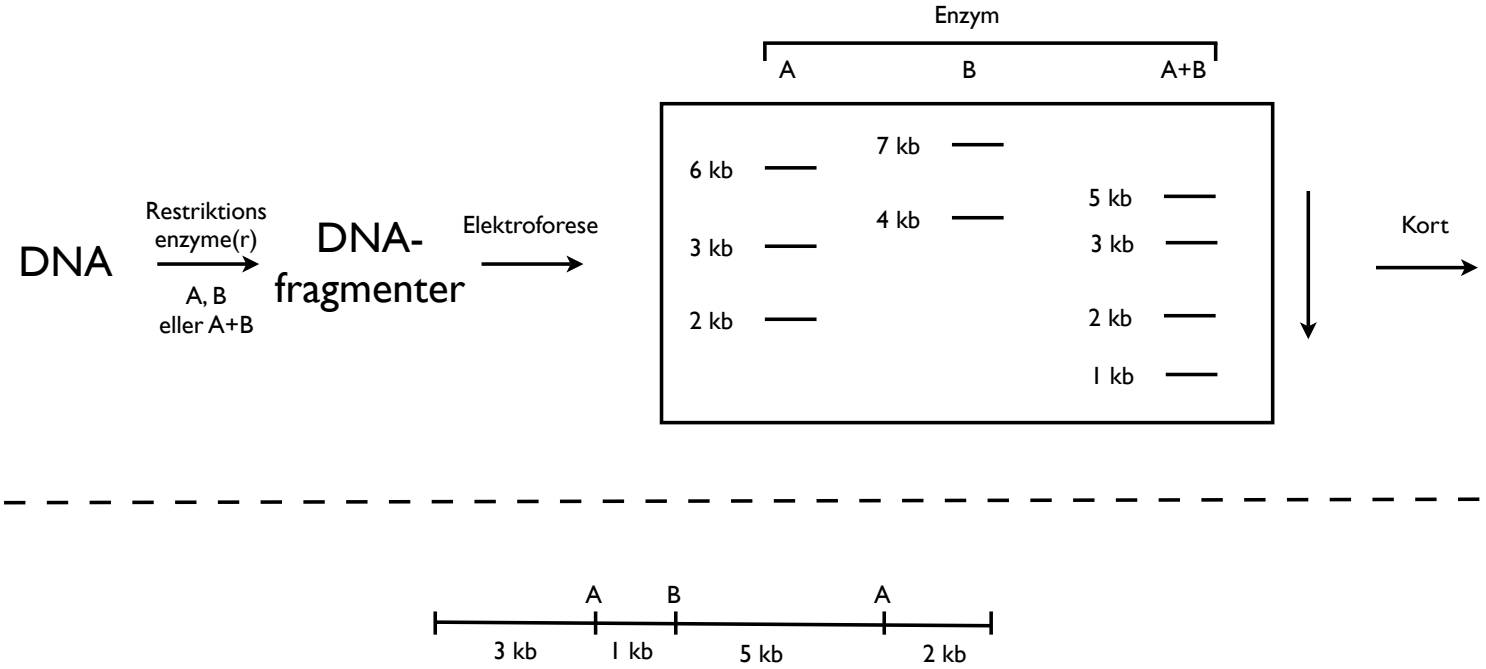
PCR


Cyklus 0
5'
3'
3'
5'
Sekvens som skal amplificeres
Uamplificeret DNA
2 strenge
Cyklus 1
Primer
5'
3'
3'
5'
3'
5'
5'
3'
3'
5'
Denaturering og annealing af primere
Primer
Primer ekstension
Nu 4 strenge
Cyklus 2
Denaturering og annealing af primere
Primer ekstension
Nu 8 strenge
Cyklus 3
Denaturering og annealing af primere
Primer ekstension
Nu 16 strenge
Cyklus 4-25

Restriktionskort 1

- For at kunne orientere sig i en meget lang DNA-sekvens laves et såkaldt restriktionskort
- Det pågældende DNA kløves med flere forskellige restiktionsenzymer enkeltvis eller i forskellige kombinationer
- På basis af de fremkomne/resulterende DNA-fragmenter samles et restriktionskort visende de relative positioner for kløvnings-stedet af hvert af enzymerne

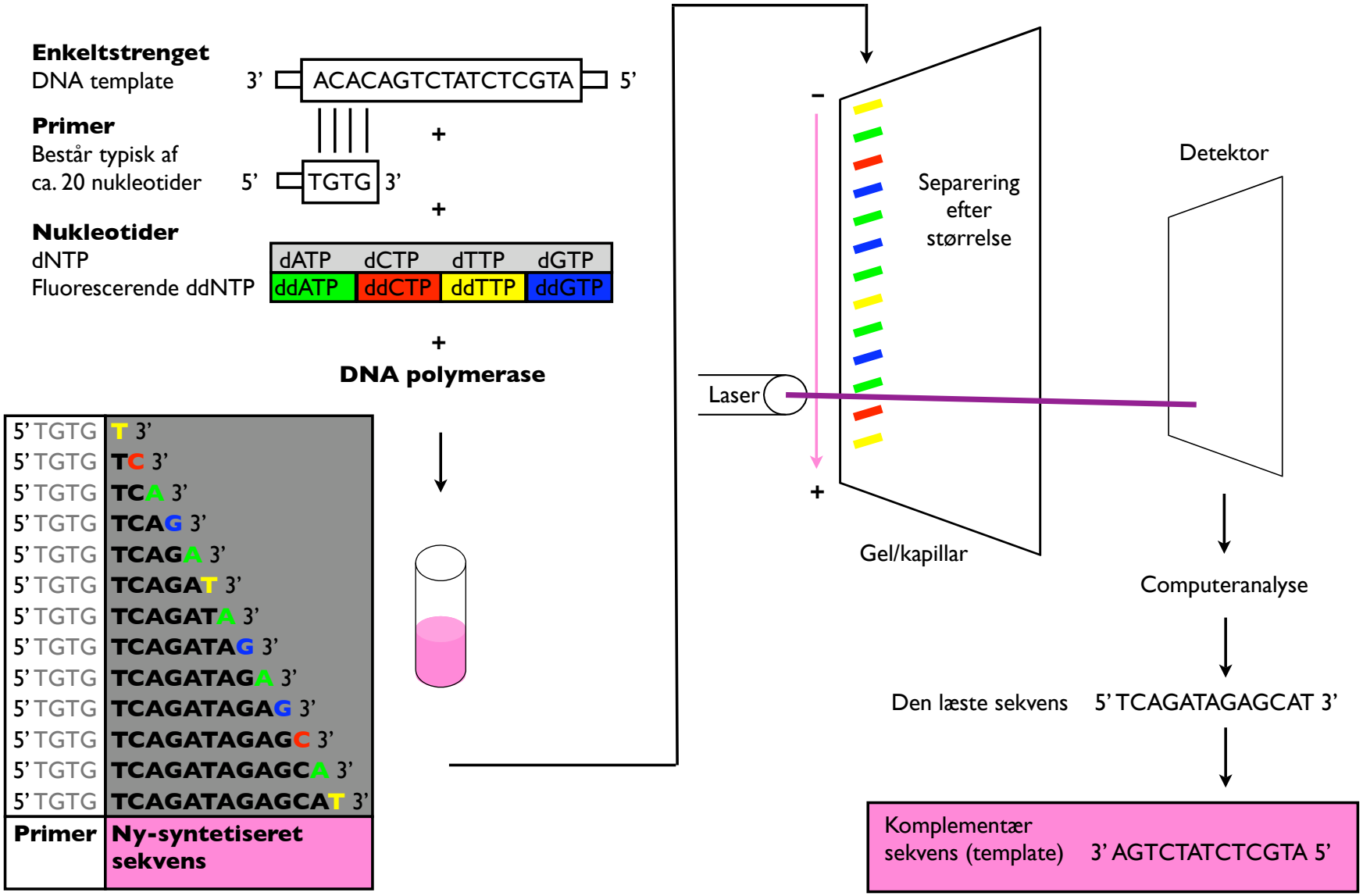
Restriktionskort 2



Kloning

- Plasmider
- “Klippe/klistre” med restriktionsenzymer/ligaser
- Rekombinant DNA
- Genomisk DNA
- cDNA
- Prober vs primere

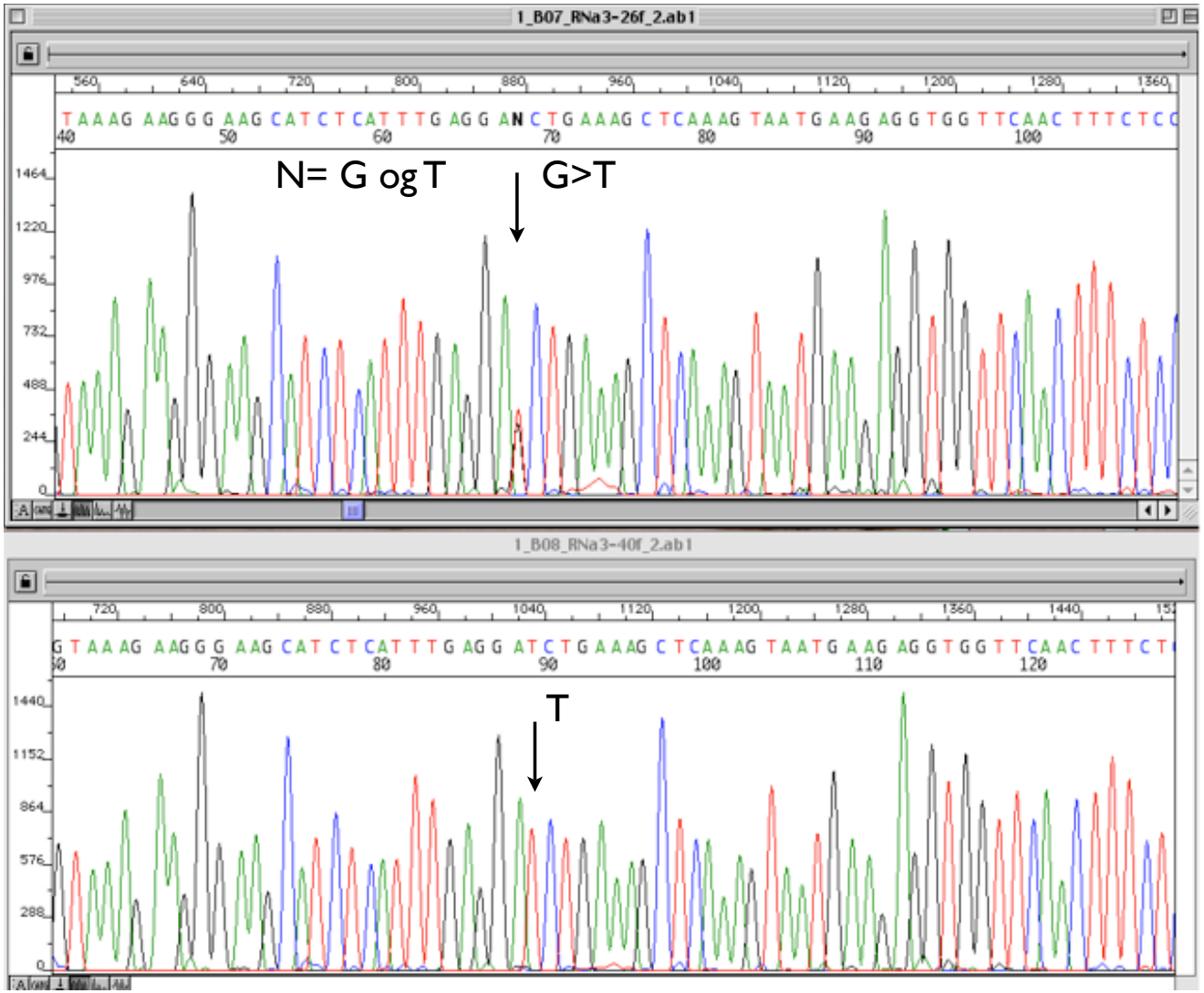
Sekventering



Eksempel på automatiseret DNA-sekventering

Mutant

Normal



Farvekode:

A

G

T

C

Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)

på f.eks. metafasekromosomer eller interfase-kromosomer

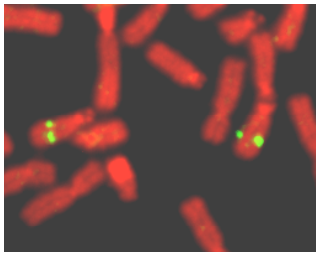
1. Blodprøve

2. Dyrkning af celler

3. Tilsæt colchicine
(ødelægger téntrådsapparatet)

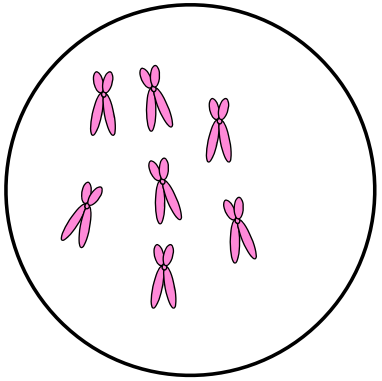
4. Fikśer celler

5. Spred celler på præparatglas vha. "dråbeteknik"



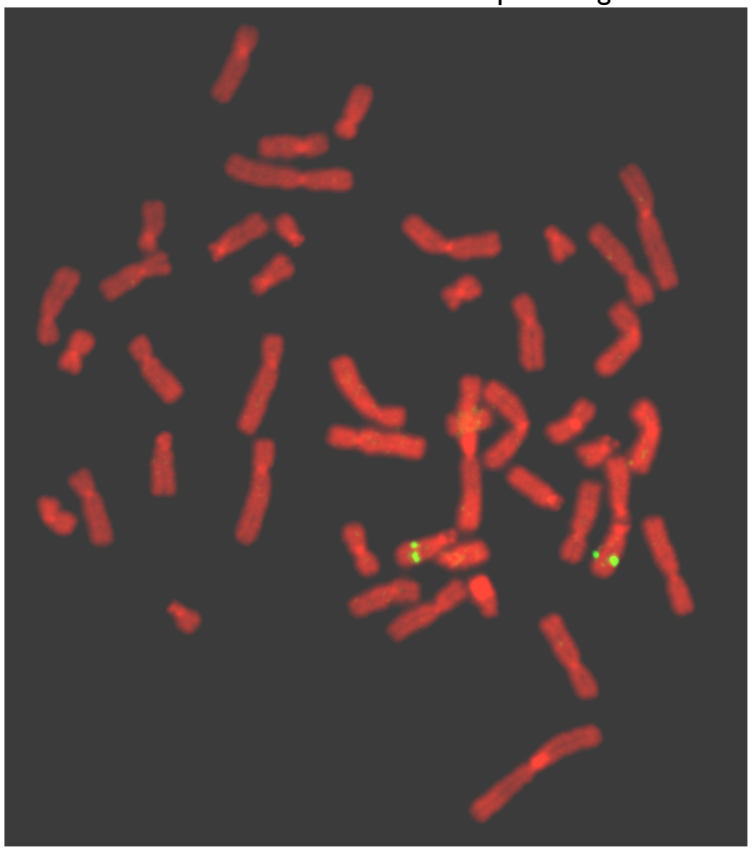
7. Hybridisering med fluorescerende denatureret probe

6. Denaturering

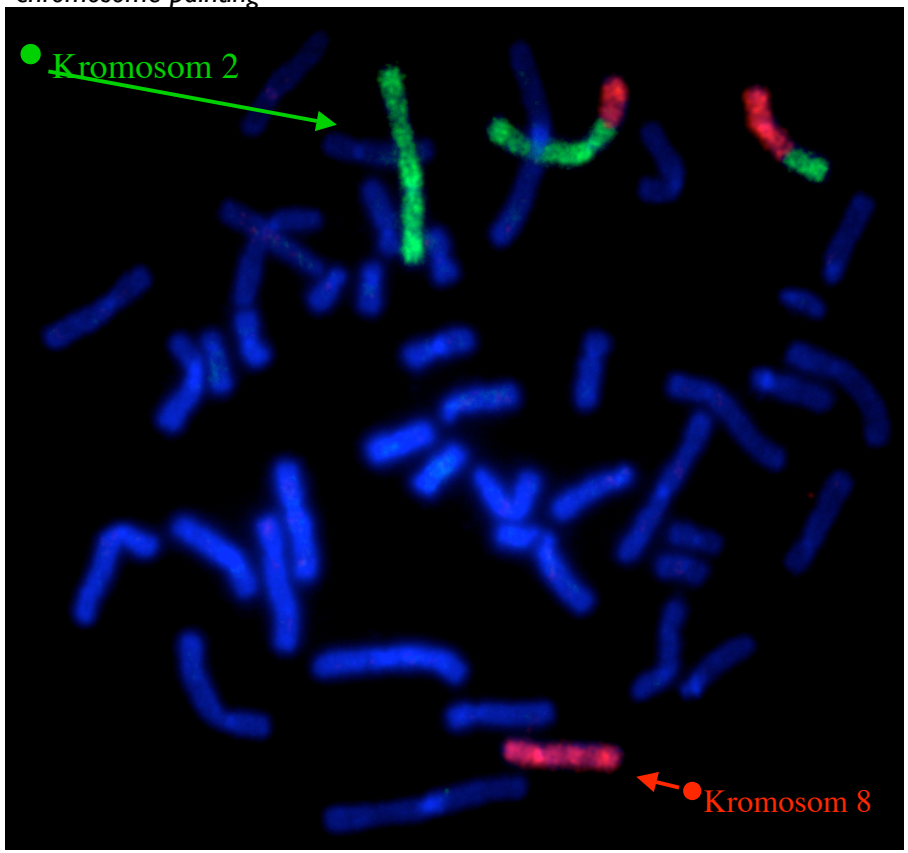


Eksempler på FISH

1. Identifikation af *ClpX* genet på kromosom 15q22. Bemærk at alle fire søsterkromatider indeholder probe-signal



2. Balanceret translokalisation t(2;8) detekteret v.h.a. *chromosome painting*

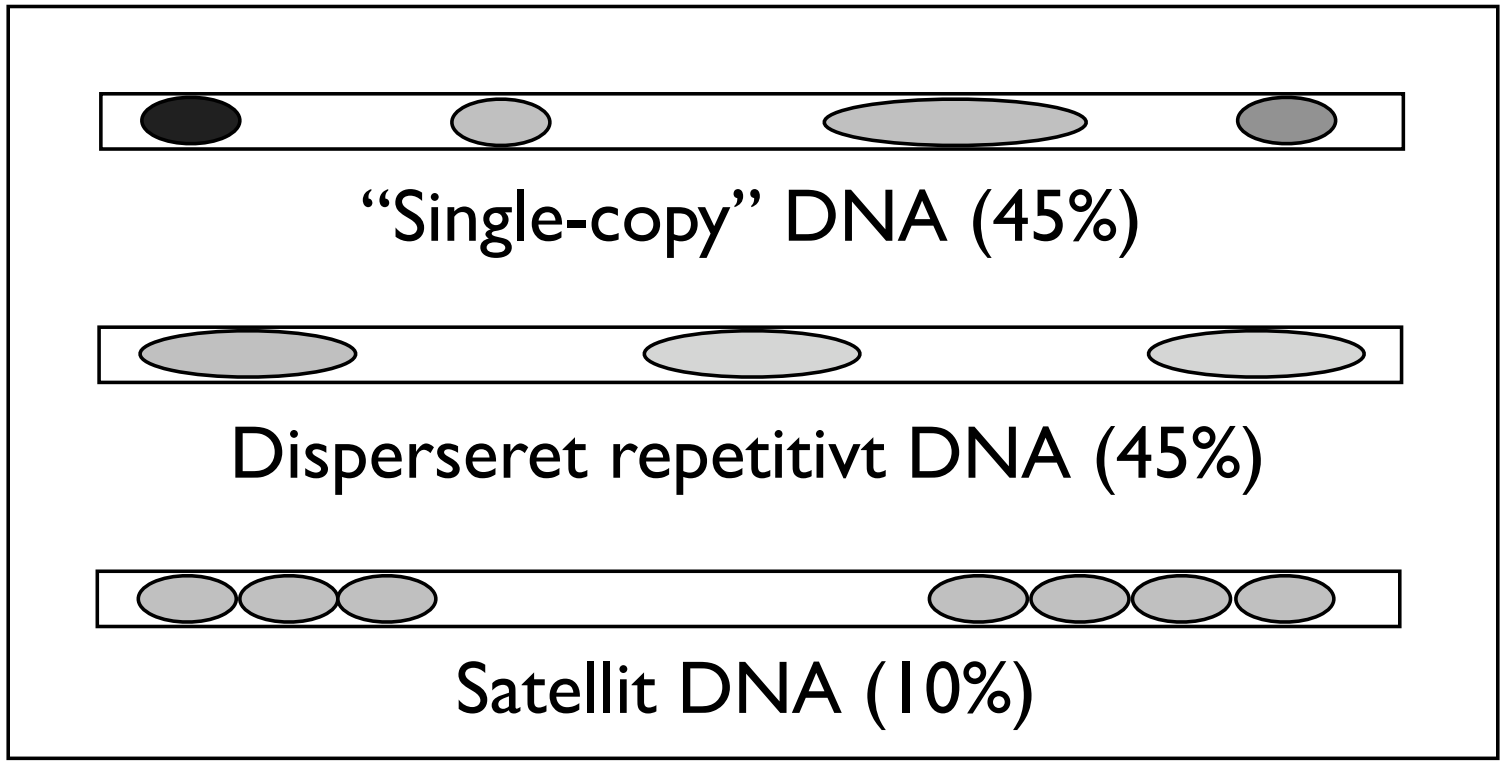


FISH: Anvendelsesmuligheder

- Translokation
- Deletion
- Duplikation
- Lokalisation af unik DNA-sekvens

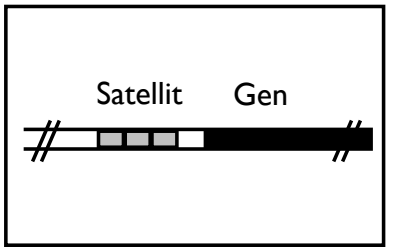
  f.eks. genlokalisation
- Kønsbestemmelse
- Aneuploidi-undersøgelse

DNA-typer


"Single-copy" DNA (45%)
Disperseret repetitivt DNA (45%)
Satellit DNA (10%)

DNA-typer (2)

- Kernen (~3x10E9 bp, haploid)
  - Single-copy (f.eks. gener: ~30.000)
  - Ekstragenisk
    - Tandem repeats
      - Satellit DNA
        - α-satellitter
        - Mini-satellitter
        - Micro-satellitter
          - F.eks. Trinukleotid repeat ekspansioner.
    - Disperseret repetitivt DNA
      - SINE (Short INterpersed Elements)
      - LINE (Long INterpersed Elements)
- Mitokondriet
  - 2 rRNA gener
  - 22 tRNA gener
  - 13 protein-kodende gener (oxidativ fosforylering)



Mini- og mikro- satellitter er af speciel interesse, da de varierer i antal blandt individer - disse DNA-markører er derfor velegnede til koblingsstudier. De optræder i arvemassen i gennemsnit 1 pr. 2 kb og udgør ialt 3% af arvemassen.

VNTR-polymorfier